

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

P20854.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :H. SHIKU et al.

Serial No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

Filed :September 30, 1999

PCT/JP99/05378

For :METHOD FOR INDUCING CELLULAR IMMUNITY AND CELLS HAVING  
INDUCED CELLULAR IMMUNITY

**CLAIM OF PRIORITY**


Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application Nos. 10-281097, filed October 2, 1998; 11-31316, filed February 9, 1999; and 11-196938, filed July 12, 1999. The International Bureau already should have sent certified copies of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copies have not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,  
H. SHIKU et al.

  
Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027 33,329

March 30, 2001  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1941 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

019585190

1995 02/14/95 10:00 AM

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT/JP 99/05378  
10.11.99

535/5378

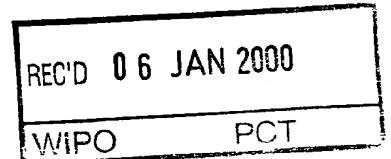
日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年10月 2日



出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第281097号

出願人  
Applicant(s):

三菱化学株式会社

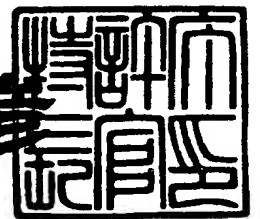
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3087584

【書類名】 特許願

【整理番号】 J02522

【提出日】 平成10年10月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/39  
A61K 47/36

【発明の名称】 細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫を誘導された細胞

【請求項の数】 11

【発明者】

    【住所又は居所】 三重県津市一身田上津部田 1 5 4 7 - 3 2

    【氏名】 珠玖 洋

【発明者】

    【住所又は居所】 滋賀県草津市若草 2 - 1 4 - 1

    【氏名】 砂本 順三

【特許出願人】

    【識別番号】 000005968

    【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

    【代表者】 三浦 昭

【代理人】

    【識別番号】 100103997

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 長谷川 曉司

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 035035

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9702254

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫を誘導された細胞

【特許請求の範囲】

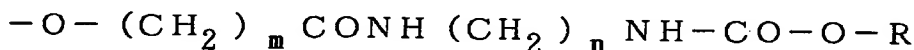
【請求項1】 疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより細胞性免疫が誘導された細胞。

【請求項2】 抗原提示細胞が樹状細胞 (dendritic cell) である請求項1に記載の細胞。

【請求項3】 疎水化多糖類が、アルキル基またはステロール残基が導入された多糖類であることを特徴とする請求項1または2に記載の細胞。

【請求項4】 疎水化多糖類が、多糖類を構成する糖単位100個あたり1～5個の糖単位の1級水酸基が式

【化1】



(式中、Rはアルキル基またはステロール残基を、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す) で表される基を有することを特徴とする多糖類である請求項3に記載の細胞。

【請求項5】 多糖類が、プルランまたはマンナンであることを特徴とする請求項1ないし4のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項6】 ステロール残基が、コレステロール残基であることを特徴とする請求項3又は4に記載の細胞。

【請求項7】 抗原が、MHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示され、細胞障害性T細胞を惹起するタンパク質であることを特徴とする請求項1ないし6のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項8】 抗原が、ErbB-2タンパク質であることを特徴とする請求項1ないし6のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項9】 抗原が、癌細胞抗原、ウイルス抗原または自己抗原反応性T細胞レセプターである請求項1ないし6のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項10】 疎水化多糖類と抗原との複合体を生体外で抗原提示細胞に反応させることを特徴とする細胞性免疫の誘導化方法。



【請求項 11】 生体内から抗原提示細胞を取り出し、疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に反応させた後、再び生体内に戻すことを特徴とする、生体内細胞性免疫の誘導方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫の誘導された細胞に関する。さらに詳細には、疎水化多糖類と抗原からなる複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより、従来のワクチンよりも細胞性免疫、特に抗原に特異的な細胞障害性T細胞（以下これを「CTL」と略称することがある）が活性化・誘導される。

【0002】

【従来の技術】

CTLは、癌細胞もしくはウイルス感染細胞をそのT細胞レセプターなどを介して特異的に認識して破壊・傷害し、生体内での癌もしくはウイルスに対する生体防御機構として重要であることが知られている。さらに、CTLのT細胞レセプターは癌細胞もしくはウイルス感染細胞の表面に発現されている特異抗原を直接認識するのではなく、マクロファージ、樹状細胞といった抗原提示細胞や癌細胞もしくはウイルス感染細胞それ自身の表面に発現されているMHCクラスI抗原及びそれに結合した特異抗原由来のオリゴペプチド（その特異抗原の「CTLエピトープ」）の複合体を認識することが近年明らかになった。

【0003】

そのようなMHCクラスI抗原／特異抗原由来のオリゴペプチド複合体は以下のようなプロセッシング経路を経て生成され则认为られている。即ち、抗原蛋白質が細胞質内で合成された後、一部は細胞内のプロテアーゼ複合体（「プロテアソーム」）によりオリゴペプチドに分解される。その後、さらにその一部（9～10アミノ酸残基）が小胞体膜に存在する輸送タンパク質、TAP（transporter in antigen processing）により細胞質から小胞体膜内に輸送され、その中でMHCクラスI抗原との親和性の高いものが

優先的にMHCクラスI抗原と結合し、細胞表面に現われる。

【0004】

そこで、癌細胞、ウイルス感染細胞または自己抗原反応性リンパ球を排除することによる癌、ウイルス疾患または自己免疫疾患の治療または予防を目的として、人為的にCTLを活性化するためには、特異抗原を発現する癌細胞もしくはウイルス感染細胞それ自身で生体を免疫するか、または特異抗原またはそれ由来のオリゴペプチドを抗原提示細胞の上記のプロセッシング経路に導入してMHCクラスI抗原との複合体として発現させることが必要である。

【0005】

実際には、上記のような「CTL活性化ワクチン」を開発するため、1) 特異抗原タンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクターなどを用いて導入する、2) いくつかのCTLEpitopeを含む、ある程度の大きさの特異抗原タンパク質を何らかの方法で細胞質内に導入する、3) CTLEpitopeとなりうる特異抗原由来9~10アミノ酸のオリゴペプチドを直接抗原提示細胞のMHCクラスI抗原に結合させる、といったアプローチが試みられている。

【0006】

このうち、1)の方法はいわゆる遺伝子治療に相当し、一般的にその効果・安全性については未だ評価の定まるところではない。また、3)のアプローチについては動物実験等によって効果が確かめられてはいるものの、ヒトに応用することを考えた場合実際的な問題が生じると考えられる。即ち、患者一人一人の持つMHCクラスI抗原には様々な種類が存在するため、そのような多様性に対応して生じるCTLEpitopeの多様性をカバーする必要がある。つまり、各々のMHCクラスI抗原に対する高親和性オリゴペプチドのアミノ酸配列モチーフを明らかにし、さらに各々のMHCクラスI抗原に対応するカスタム化を医薬品として実現せねばならず、その開発は現実的には極めて困難と想像される。

【0007】

一方、2)のアプローチについてはいくつかの具体的な実施例が知られており、効果・安全性の点で満足でき、かつ様々な患者に対して適用可能なCTL活性化ワクチン開発に結びつく可能性がもっとも高いと考えられる。実際に、特異抗

原タンパク質をポリペプチドのまま生体に投与して特異的CTLを活性化する場合、何らかのアジュバントとの混合物として投与することが多い。例えば、イスクム (ISCOM) (Takahashi et al., Nature, 344, 873-875, 1990)、QS-21 (Newman et al., J. Immunol., 148, 2357-2362, 1992)、マンナン被覆リポソーム (WO92/4887公報)、AF (Raychaudhuri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8308-8312, 1992) といったものが知られている。

## 【0008】

ところで、多糖類-コレステロール誘導体に関しては、リポソームの多糖被覆剤として使用できること (特開昭61-69801号公報)、脂肪乳剤被覆剤 (特開昭63-319046号公報) として使用できることが知られている。また、前述のようにマンノースを含む多糖類で被覆された癌細胞抗原またはウイルス抗原-リポソーム複合体、すなわち (抗原) タンパク質をリポソーム化または脂肪乳剤化したのち、多糖類-コレステロール誘導体で被覆するものが、CTL誘導活性を有することも知られている (WO92/4887公報参照)。

また、多糖類-コレステロール誘導体と (抗原) タンパク質のみからなる複合体に関しても、さらに有用なワクチンとなりうることが知られている (WO98/9650公報参照)。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、より効率的に細胞性免疫を誘導させる方法について鋭意検討した。その結果、天然多糖にアルキル基またはコレステロール基を導入した疎水化多糖類と抗原タンパク質との複合体を生体外で、抗原提示細胞に反応させることで、効率良く細胞性免疫が活性化され生体防御反応をもたらすことを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0010】

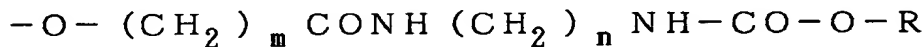
すなわち、本発明によれば、疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に

生体外で反応させることにより細胞性免疫が誘導された細胞；抗原提示細胞が dendritic cell である上記の細胞；疎水化多糖類が、アルキル基またはステロール残基が導入された多糖類であることを特徴とする上記の細胞；

疎水化多糖類が、多糖類を構成する糖単位100個あたり1～5個の糖単位の1級水酸基が式

【0011】

【化2】



【0012】

(式中、Rはアルキル基またはステロール残基を、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す)で表される基を有することを特徴とする多糖類である上記の細胞；多糖類が、プルランまたはマンナンであることを特徴とする上記の細胞；ステロール残基が、コレステロール残基であることを特徴とする上記の細胞；抗原が、MHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示され、細胞障害性T細胞を惹起するタンパク質であることを特徴とする上記の細胞；抗原が、Erbb-2タンパク質であることを特徴とする上記の細胞；抗原が、癌細胞抗原、ウイルス抗原または自己抗原反応性T細胞レセプターである上記の細胞；疎水化多糖類と抗原との複合体を生体外で抗原提示細胞に反応させることを特徴とする細胞性免疫の誘導化方法；生体内から抗原提示細胞を取り出し、疎水化多糖類と抗原との複合体を抗原提示細胞に反応させた後、再び生体内に戻す方法が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。なお、本発明において「アジュバンド」とは、抗原に対する免疫応答を修飾する目的で抗原とともに用いられる物質を意味するものであり、通常は抗体産生や細胞性免疫の強化に用いられるが、場合により免疫応答の負的变化として用いられるものも包含するものである。

【0014】

(1) 抗原

本発明における抗原としては、ポリペプチド、ポリペプチド複合体、グリコプロテイン、核酸等の免疫を惹起する物質を指す。病理学的標的そのものの一部であってもよく、または新生物組織またはウイルス感染細胞等の病んだ組織が発現する抗原であってもよい。本発明においては、抗原タンパク質、なかでもMHCクラスI抗原にオリゴペプチドとして提示され、CTLを惹起するタンパク質が用いられる。抗原タンパク質は、そのような抗原決定基を含んでいれば特に起源、純度にこだわるものではない。望ましくは遺伝子組み換え法により作製したものが好適である。抗原タンパク質の分子量は、抗原決定基を含めば特に限定されないが、一般的に500~100,000、好ましくは2,000~100,000である。ペプチド断片としては、アミノ酸数が30個以上のものが好適に用いられる。具体例としては、癌遺伝子産物、ErbB-2 (HER2と略することもある) タンパク質、ras p21タンパク質、癌抑制遺伝子産物p53タンパク質、ウイルス由来タンパク質またはT細胞レセプター、例えば自己抗原反応性 (自己免疫疾患惹起) T細胞レセプター等の全体ならびにそれらの部分配列を含むタンパク質などが挙げられる。

【0015】

## (2) 疎水化多糖類

疎水化多糖類の作製法並びに疎水化多糖類集合体微粒子の作製方法については秋吉らの方法 (Akiyoshiら, *Macromolecules*, 26, 3062-3068 (1993), Akiyoshi et al., *J. Proc. Japan. Acad.*, 71, 71B, 15 (1995)、特開昭61-69801号公報、特開平3-292301号公報、特開平7-97333号公報) を用いることができる。

【0016】

疎水化多糖類における多糖類としては、単糖残基が互いにグリコシド結合してできた高分子をいい、糖類成分は、単糖類、例えば、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース等から、または二糖類またはオリゴ糖類からも誘導できる。糖類単位は1, 2-, 1, 3-, 1, 4-または1, 6-グリコシド結合していてもよい。 $\alpha$ -または $\beta$ -型結合のいずれであってもよい。鎖は直鎖上で

も枝分かれしていても良い。糖類成分はグルコースであるものが好ましく、具体的には、天然または合成由来のプルラン、デキストラン、アミロース、アミロペクチン及びマンナンが挙げられ、好ましくはマンナンまたはプルランが用いられる。

#### 【0017】

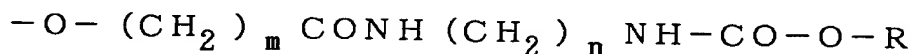
本発明においては、上記のような多糖類に疎水基を導入して疎水化多糖類を作成する。疎水化多糖類としては、特開平7-97333号公報に記載のようなリンカーを介して結合しているものであってもよい。

疎水基としては、例えば1本鎖及び2本鎖のアルキル基またはステロール残基を100単糖あたり1～5個（重量比で5%以下）導入したものが望ましいが、特にこれに限定されるわけではなく、封入される抗原の分子量や等電点に応じて封入率のよいものを用いることができる。なお、ステロール残基としては、例えば、コレステロール、スチグマステロール、 $\beta$ -シトステロール、ラノステロール、エルゴステロール残基などが挙げられるが、好ましくは、コレステロール残基である。また、アルキル基としては、好ましくは炭素数20以下、さらに好ましくは炭素数10～18であり、直鎖又は分岐鎖のいずれであってもよい。

本発明における疎水化多糖類としては、多糖類を構成する糖単位100個あたり1～5個の糖単位の1級水酸基が式

#### 【0018】

##### 【化3】



#### 【0019】

（式中、Rはアルキル基またはステロール残基を、mは0または1を、nは任意の正の整数をそれぞれ示す）で表されるものが好ましい。ここで、アルキル基又はステロール残基としては上記したものが挙げられ、nは好ましくは1～8である。

#### （3）疎水化多糖類による抗原の封入方法

疎水化多糖類と抗原との複合体は、疎水化多糖類の集合体微粒子と抗原とを室温で混合した後に、ゲルクロマトグラフ法で処理することにより単離・精製でき

る (Nishikawa, *Macromolecules*, 27, 7654-7659 (1994))。

このようにして得られた疎水化多糖類と抗原との複合体はそのまま本発明のワクチン製剤に用いることができるが、必要に応じて常法に応じて滅菌等の操作を施すことも可能である。

#### 【0020】

##### (4) 抗原提示細胞

抗原提示細胞とは、生体に侵入した異物の情報をリンパ球に伝えその活動を促す物質のことを指し、これをきっかけにして免疫系が動き出す。例えば、樹状細胞 (dendritic cell)、マクロファージ (貪食細胞)、B細胞、肝臓のクッパー細胞、胸腺上皮細胞などが挙げられる。これらの細胞には主要組織適合抗体 (MHC) クラスIに加えて主要組織適合抗体 (MHC) クラスIIが発現されている。

#### 【0021】

樹状細胞を得る方法については、以下の例に限定されないが、例えば動物細胞、例えばマウスから骨髓細胞を取り出し、抗体等で調整後骨髓幹細胞群を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 等の存在下数日間培養することにより得ることができる。また、例えばヒトの末梢血単核球をフィコールコンレイ法等により分離培養し、付着細胞をGM-CSF及びインターロイキン (IL-4) 等の存在下数日間培養することにより得ることができる。

#### 【0022】

##### (5) 複合体と抗原提示細胞 (樹状細胞) を反応させる方法

上記(4)のようにして得られた樹状細胞に、上記(3)の疎水化多糖類と抗原との複合体の懸濁液を好ましくは100  $\mu$ g/mlタンパク濃度に加え、培養することで反応させることができる。

##### (6) 細胞性免疫の誘導化

上記複合体が樹状細胞と反応することで、細胞性免疫が誘導されているかについては、樹状細胞とT細胞群 (例えばCD4 T細胞群、CD8 T細胞群、ペプチドを認識するように作成されたCTLクローン (例えばMHCクラスIに特異的

に作用することが知られているHER2の63-71番めのアミノ酸配列を有するペプチドを認識するように作成されたHER2 p63-71というCTLクローン)等)と混合培養させることで、T細胞群の樹状細胞の殺傷力や刺激・増殖力をラジオアイソトープ等を用いて確認することができる。

【0023】

また上記(5)で得られた細胞は、生体内に戻すことにより、生体内での細胞性免疫を誘導することができる。

例えば細胞性免疫を誘導された樹状細胞はその活性化を維持した状態(例えば通常用いられる緩衝液や血液成分等を含む溶液中)で、生体内(例えば血中や骨髓中)に注射等の方法で戻すことができる。例えば次の3文献に記載の方法等により生体内に戻すことができる。

(NATURE MEDICINE, 4(3), 328-332(1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 8078-8082(1995), Cancer Res., 56, 2479-2483(1996))

【0024】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

(実施例1)

コレステロール化マンナンまたはプルランと癌遺伝子産物ErbB-2タンパク質との複合体の調製

疎水化多糖は秋吉らの方法(Akiyoshi et al., Macromolecules, 26, 3062-3068(1993))によって合成した。その結果、コレステロール化マンナン(以下、「CHM-55-2.3」と略記する)としては、分子量約55,000のマンナン(シグマ社製)に100単糖当たり約2.3個のコレステロール残基が導入された。また、コレステロール化プルラン(以下、「CHP-108-0.9」と略記する)としては、分子量約108,000のプルラン(林原生物化学研究所製)に100単糖当



り約0.9個のコレステロール残基が導入された。水溶液中では、1つの集合体当たり平均7分子のコレステロール残基が会合して形成された疎水性ドメインが約7個含まれるものとなった。

【0025】

上記疎水化多糖をDMSOに溶解した後、PBS (pH7.9)に透析し、さらにプローブ型のソニケーター(トミー精工製URP)を用い、40Wで10分間超音波処理した。このものを1.2 $\mu$ m、0.45 $\mu$ m、0.2 $\mu$ mの順でフィルター濾過することによって疎水化多糖微粒子水溶液を得た。各溶液の疎水化多糖濃度をフェノール硫酸法で定量した結果、CHP-108-0.9は9.62mg/ml、CHM-55-2.3は6.97mg/mlであった。

【0026】

一方、癌原遺伝子ヒトErbB-2タンパク質のアミノ酸の1番目から147番目に相当するポリペプチド(Coussens et al., Science, 230, 1132, 1985)のN末端にヒスチジン・ヘキサマーを融合させた組み換えタンパク質を大腸菌を用いて発現させ、抗原タンパク質として用いた。即ち、下記に示すオリゴヌクレオチド・プライマー2本を用いて、ヒトErbB-2タンパク質のアミノ酸の1番目から147番目に相当するポリペプチドをコードする部分を含むcDNAをPCR法にて増幅した。

【0027】

TS1: 5' - GGATCCATATGGCTGGCGGCCT - 3'

(配列表の配列番号1)

TS2: 5' - CGACTGGATCCTATGTGAGACTTC - 3'

(配列表の配列番号2)

得られた449bpのDNA断片を制限酵素NdeIおよびBamHIで切断した。さらに発現プラスミドベクターpET15b(Novagen社)を制限酵素NdeIおよびBamHIで切断した。このようにして作製されたpET15b由来の約5.7kbpのNdeI-BamHI断片に上記ヒトErbB-2 cDNAのPCR DNA断片をライゲーション・キット(宝酒造製)を用いて連結し、大腸菌BL21(DE3)(Novagen社)を形質転換した。ア

ンピシリン耐性のクローンを選別した後、添付されたNovagen社マニュアルにしたがって、組み換えタンパク質を精製した。通常1リットルの培地で培養した組み換え体から、およそ20mgの組み換えタンパク質を得た。

#### 【0028】

上記のようにして得た、疎水化多糖水溶液にヒトErbB-2組み換えタンパク質溶液(PBS/6M尿素中にタンパク質2.0mg/mlを含む)を加え、混合することで、無色透明の疎水化多糖と抗原との複合体を含有する水溶液(CHMまたはCHP 5mg/ml、ヒトErbB-2組み換えタンパク質0.25mg/ml)を得た。これについてDLS(Dynamic Light Scattering)測定を行った結果、粒径約250nm、 $k_2/k_{12}=0.156$ の複合体微粒子を得たと考えられた。以下、かくして得られたコレステロール化マンナンとErbB-2タンパク質との複合体を「CHM-erbB2」、コレステロール化プルランとErbB-2タンパク質との複合体を「CHP-erbB2」と略記する。

#### 【0029】

一方、疎水化多糖が存在しない同一緩衝液を用いた条件では、ヒトErbB-2組み換えタンパク質は全て不溶化し、沈殿として析出した。

免疫実験の陰性対照としては、Carbonic Anhydrase II(シグマ社製、以下「CAB」と略記する)を用いて疎水化多糖とタンパク質との複合体を作製した。以下、コレステロール化マンナンとCABとの複合体を「CHM-CAB」と、コレステロール化プルランとCABとの複合体を「CHP-CAB」と略記する。

#### 【0030】

##### (実施例2)

5匹のメスBALB/cマウスに実施例1で調整したCHP-erbB2の懸濁液をタンパク質として、1匹あたり20ngを1週間間隔で2回皮下免疫した。最終免疫から1週間後に免疫細胞より脾臓細胞を取り出しナイロンウールカラムを用いてT細胞を選択的に選り分けた。得られたT細胞群を抗CD4モノクローナル抗体、抗CD8モノクローナル抗体及び補体源としての家兎血清を用い、

抗体及び補体にて処置し、CD4 T細胞群、CD8 T細胞群及びCD4とCD8 T細胞の混合群を調整した。一方6匹のメスBALB/cマウスより骨髓細胞を取り出し、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗B細胞抗体及び補体源としての家兎血清を用いて処置し、骨髓幹細胞群を調整した。得られた細胞群をGM-CSF (100 unit per ml) の存在下にて6日間培養を行い、骨髓由来樹状細胞群を調整した。得られた樹状細胞群にCHP-erbB2の懸濁液またはCHP-CABの懸濁液をタンパク質にて100 µg/mlの濃度にて加え3時間混合培養した後に樹状細胞群を洗浄し、さらに18時間培養を続けた。

【0031】

その後先に述べたCHP-erbB2の懸濁液にて免疫されたマウスより得られたCD4細胞群、CD8細胞群及びその混合細胞群とマイトマイシンCにて処置した前述の樹状細胞群と混合培養し、72時間後に<sup>3</sup>Hチミジンを加えてT細胞群の増殖を観察した。

図1に見られる如く、CHP-erbB2の懸濁液により免疫された。CD4 T細胞、CD8 T細胞及びその混合細胞群はいずれもがCHP-erbB2により処理された樹状細胞群とのみ反応し、細胞増殖を示したが、CHP-CAB懸濁液にて処理された樹状細胞群及び全く未処置の樹状細胞群によるT細胞群の増殖刺激は認められなかった。尚、図中ではerbB2をHER2として表してある。

【0032】

(実施例3)

HLA-A2402 (HER2 p63-71を認識する) 又はHLA-A0201を有した正常人末梢血単核球をヒコールコンレイ法により分離した。細胞をプラスチックプレート上で2時間培養した後に、浮遊細胞を除去し、付着細胞をGM-CSF (1000 unit per ml) 及びIL-4 (100 unit per ml) 存在下にて10日間培養した。培養後、浮遊細胞を回収し、骨髓由来樹状細胞として使用した。

【0033】

得られた樹状細胞にCHP-erbB2懸濁液又はCHP-CAB懸濁液を何

れもタンパク量 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濁度にて3時間培養した。細胞を2回洗浄後、さらに16時間培養した後に $\text{Sodium Cr}^{61}$  ( $50\mu\text{l}:100\text{mCi}$ )にて標識し、細胞傷害性試験を行った。エフェクター細胞としては、HLA-A2402を有した正常人末梢血リンパ球を $\text{erbB2 p63-71}$ ペプチドパルスした自家樹状細胞で感作して誘導樹立したCD8陽性HLA-A2402拘束性で同ペプチドを認識するCTLクローンを用いた。

#### 【0034】

その結果図2に示される如くCTLクローンは、CHP- $\text{erbB2}$ 懸濁液にて処理されたHLA-A2402由来の樹状細胞を優位に殺傷したが、同一人由来でCHP-CAB懸濁液で処置された樹状細胞やHLA-A2402を有していない(HLA-A0201を有する)健常人より調整された樹状細胞をCHP- $\text{erbB2}$ 懸濁液で処置したもの及び同樹状細胞をCHP-CAB懸濁液で処置した細胞に対しては障害活性を示さなかった。

#### 【0035】

##### (実施例4)

HLA-A2402を有した健常人末梢血単核球より前述の如く調整された樹状細胞をCHP- $\text{erbB2}$ 懸濁液、 $\text{erbB2}$ タンパクのみ、CHP-CAB懸濁液、CABタンパクのみにておのおのタンパク量 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にて3時間共培養した後に洗浄後、さらに15時間培養を続けた。これらの樹状細胞および $\text{erbB2 p63-71}$ ペプチドにてパルスした同一人由来樹状細胞を刺激細胞とし、先に述べた $\text{erbB2 p63-71}$ ペプチド特異的CD8陽性HLA-A2402拘束性のCTLクローンに対する刺激能を検討した。

#### 【0036】

図3に示される如くCHP- $\text{erbB2}$ タンパク懸濁液にて処置された樹状細胞および $\text{erbB2}$ 由来 $\text{p63-71}$ ペプチドをパルスした樹状細胞は、無処理樹状細胞に比して優位にCTLクローンを刺激し、増殖させた。このことよりCHP- $\text{erbB2}$ タンパクは樹状細胞に $\text{erbB2}$ タンパクを取り込ませた後、同タンパクに由来する $\text{p63-71}$ ペプチドを樹状細胞上のHLA-A2402分子と共に表示するべく機能することが明らかとなった。

【0037】

【発明の効果】

本発明の細胞性免疫を誘導された抗原提示細胞は、従来のワクチンよりも効率良く細胞性免疫が誘導されており、細胞治療法としても極めて有用となりうる。

【0038】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> 細胞性免疫の誘導方法及び細胞性免疫を誘導された細胞

<130> J02522

<160> 12

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213>

<400> 1

g g a t c c a t a t g g c t g g c g g c c t

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<400> 2

c g a c t g g a t c c t a t g t g a g a c t t c

【図面の簡単な説明】

【図1】

マウスから取り出したCD4 T細胞群及びCD8 T細胞群の増殖を示す図である。

たて軸は各々CHP-HER2、CHP-CABで処理した、及び無処理のマウス樹状細胞群を示し、よこ軸は<sup>3</sup>Hチミジンのとりこみ量を示す。

【図2】

正常人から得られた樹状細胞をCHP-HER2、CHP-CABで処理したときのCTLクローンによる細胞障害活性を示す図である。

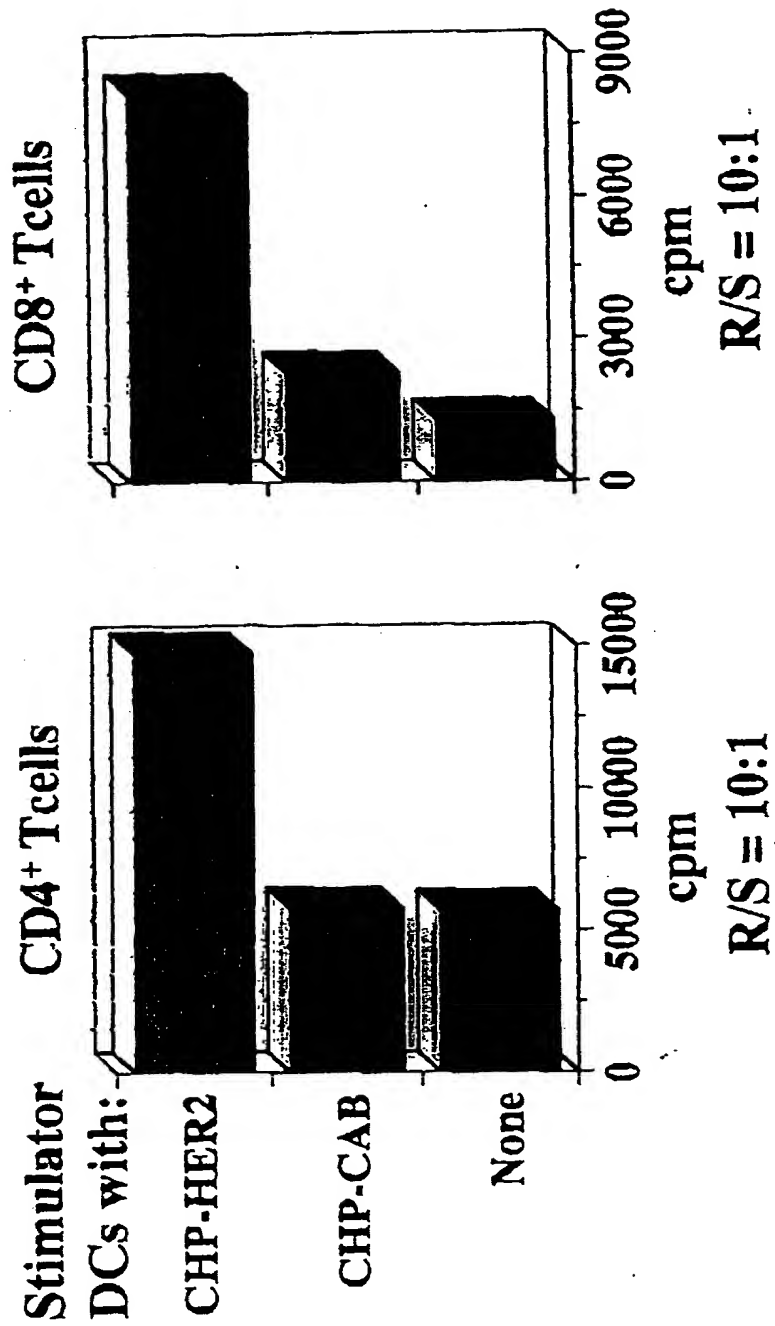
たて軸の上2段はHLA-A2402を有する正常人由来の樹状細胞を、下2段はHLA-A0201を有する正常人由来の樹状細胞をそれぞれCHP-HER2、CHP-CABで処理したものを示し、よこ軸はCr<sup>61</sup>遊離試験でのCTLクローンによる細胞障害性を示す。

【図3】

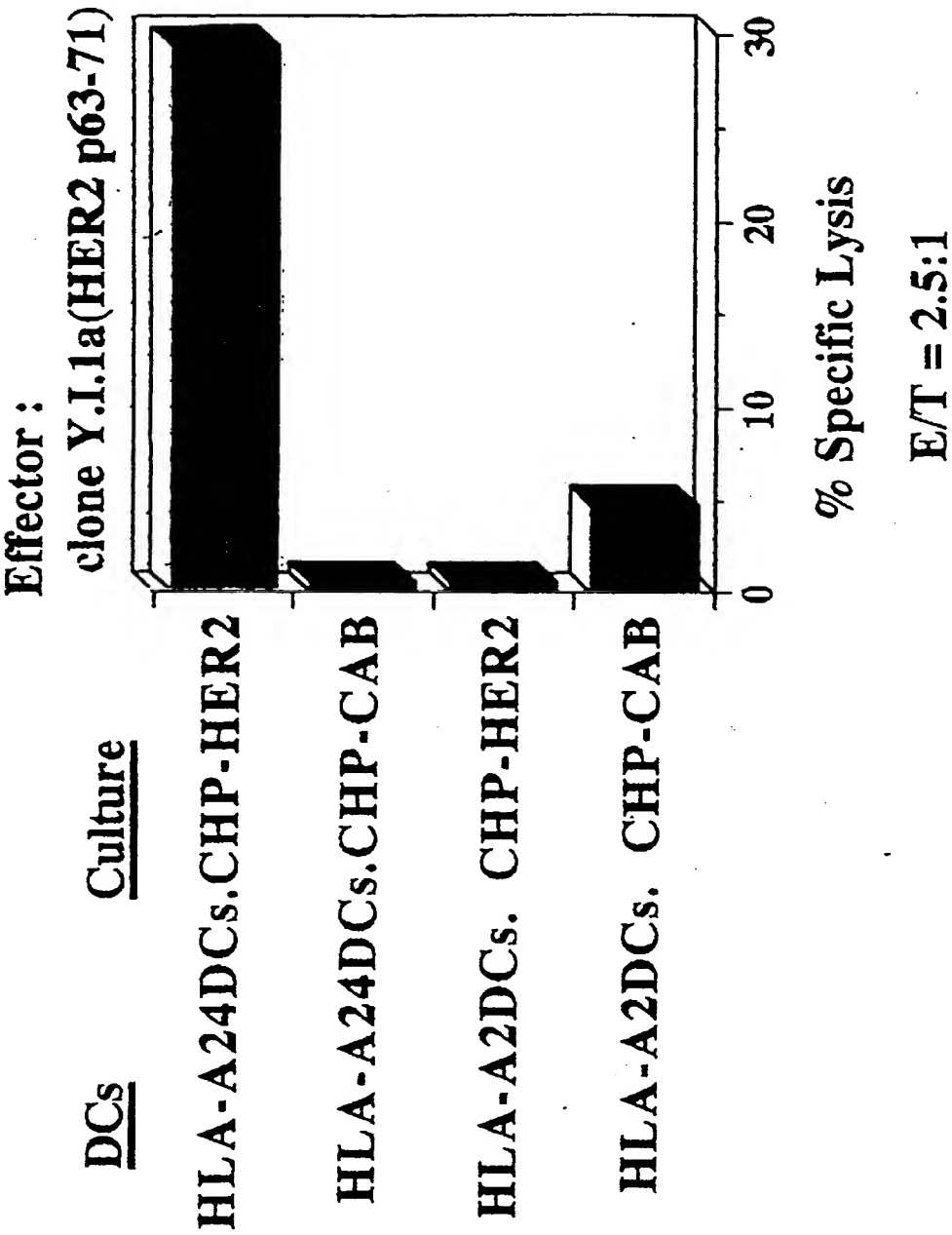
正常人から得られた樹状細胞をCHP-HER2、HER2、CHP-CAB、CAB、HER2 p63-71で処理したときのCTLクローンの増殖を示す図である。たて軸は各々CHP-HER2、HER2、CHP-CAB、CAB、HER2 p63-71（ポジティブコントロール）で処理もしくは無処理の樹状細胞を示し、よこ軸はCTLクローン（HER2 p63-71）の増殖能を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

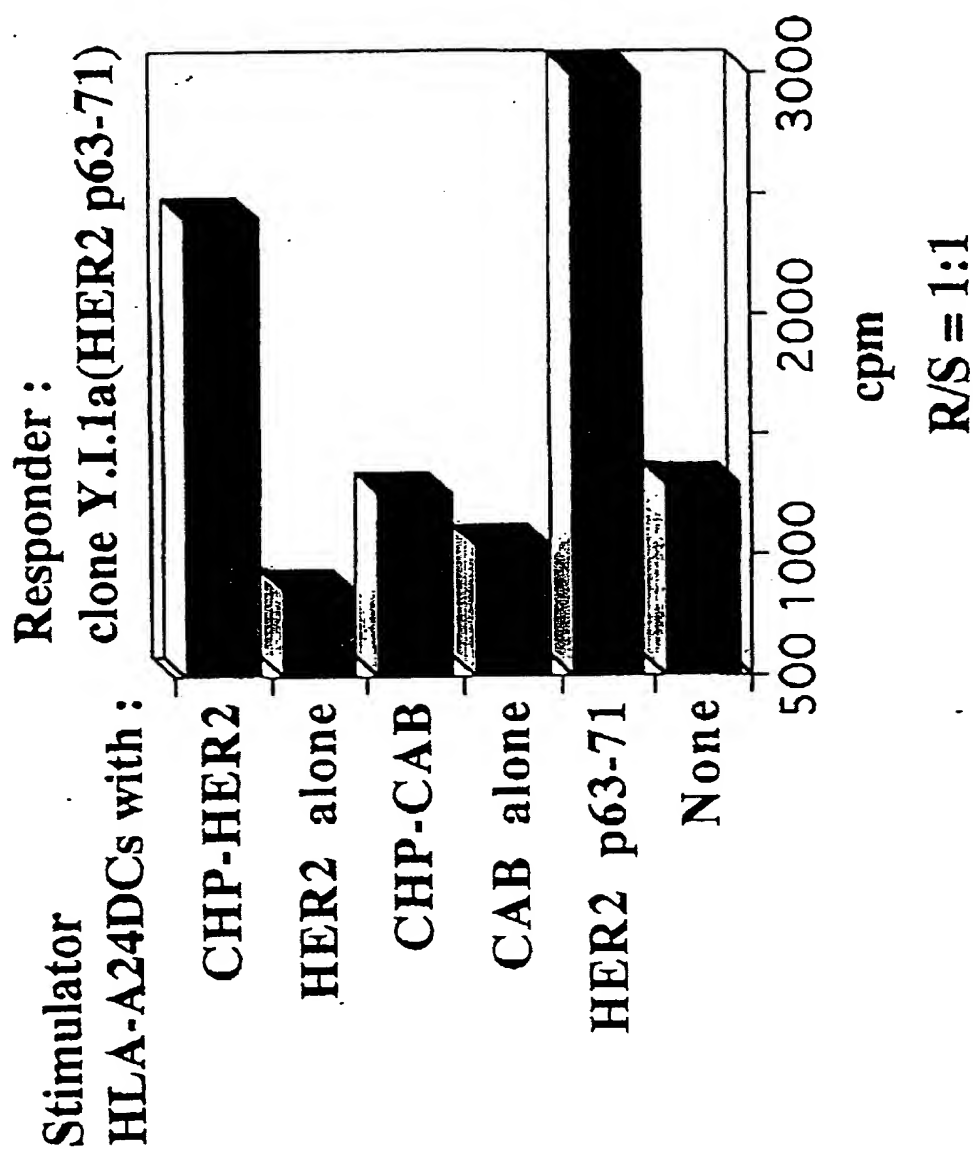


【図 2】





【图 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 より効率的に細胞性免疫を誘導する方法及び細胞性免疫を誘導された細胞を提供する。

【解決手段】 疎水化多糖と抗原との複合体を抗原提示細胞に生体外で反応させることにより細胞性免疫を誘導する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000005968  
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号  
【氏名又は名称】 三菱化学株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100103997  
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 三菱化学株式会社内  
【氏名又は名称】 長谷川 暁司

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日 1994年10月20日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

氏 名 三菱化学株式会社